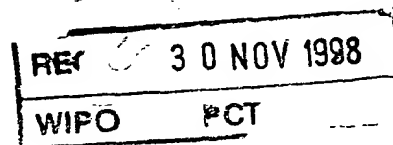


REPUBLIQUE FRANÇAISE

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **16 OCT. 1998**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



7



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **- 7 NOV. 1997**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **97 14263 -**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT
DATE DE DÉPÔT **07 NOV. 1997**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

RHONE-POULENC AGROCHIMIE
TETAZ Franck - DPI
B.P. 9163
69263 LYON CEDEX 09

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☒ demande initiale
☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent 6228 références du correspondant PH 97073 téléphone 4 72 85 25 92

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

"Gène codant pour la thanatine, vecteur le contenant et plantes transformées
tenues résistantes aux maladies"

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

RHONE-POULENC AGROCHIMIE

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s) française

Adresse (s) complète (s)

14-20 rue Pierre Baizet
009 LYON

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Franck TETAZ

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

D. GIRAUD

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9714263

(N/Réf : PH 97073)

TITRE DE L'INVENTION :

"Gène codant pour la thanatine, vecteur le contenant et plantes transformées obtenues résistantes aux maladies"

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

RHONE-POULENC AGROCHIMIE

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

DEROSE Richard
216 rue de St Cyr
69009 LYON, France

FREYSSINET Georges
21 rue de Nervieux
69450 ST CYR AU MONT D'OR, France

HOFFMANN Jules
5 rue Closener
67000 STRASBOURG, France

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Lyon, le 7 Novembre 1997

F. Tetaz

Franck TETAZ

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
20			X	19.01.98	23 JAN. 1998 - S R

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositifs de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

Gène codant pour la thanatine, vecteur le contenant et plantes transformées obtenues
résistantes aux maladies

5 La présente invention a pour objet une séquence d'ADN codant pour la thanatine, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation dudit organisme.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, la thanatine produite par les plantes transformées leur conférant une
10 résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.

Il existe aujourd'hui un besoin grandissant de rendre les plantes résistantes contre les maladies notamment fongiques afin de diminuer, voire d'éviter, d'avoir recours à des traitements avec des produits de protection antifongiques, en vue de protéger l'environnement. Un moyen d'augmenter cette résistance aux maladies consiste à
15 transformer les plantes de manière qu'elles produisent des substances à même d'assurer leur défense contre ces maladies.

On connaît différentes substances d'origine naturelle, en particulier des peptides, présentant des propriétés bactéricides ou fongicides, notamment contre les champignons responsables des maladies des plantes. Toutefois, le problème consiste à trouver de telles
20 substances qui pourront non seulement être produites par des plantes transformées, mais encore conserver leurs propriétés bactéricides ou fongicides et les conférer aux dites plantes. Au sens de la présente invention, on entend par bactéricide ou fongicide tant les propriétés bactéricides ou fongicides proprement dites que les propriétés bactériostatiques ou fongistatiques.

25 La thanatine est un peptide produit par induction bactérienne sur *Psodius sp.*, de préférence *maculiventris* adultes. Sa préparation par induction bactérienne est décrite dans la demande de brevet FR 2 733 237, de même que ses propriétés antifongiques et antibactériennes *in vitro*.

Après avoir d'abord identifié le gène de la thanatine, on a également trouvé qu'il
30 pouvait être inséré dans un organisme hôte, en particulier une plante, pour exprimer la thanatine et conférer au dit organisme hôte des propriétés de résistance aux maladies fongiques et aux maladies d'origine bactérienne, apportant une solution particulièrement avantageuse au problème énoncé ci-dessus.

L'invention a donc d'abord pour objet un fragment d'acide nucléique codant pour la
35 thanatine, un gène chimère comprenant ledit fragment codant pour la thanatine ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier dans les plantes et un vecteur pour la transformation des organismes hôtes contenant ce gène chimère, et l'organisme hôte transformé. Elle concerne aussi une cellule végétale transformée contenant au moins un fragment d'acide

nucléique codant pour la thanatine et une plante résistante aux maladies contenant la dite cellule, en particulier régénérée à partir de cette cellule. Elle concerne enfin un procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies dans lequel on insère un gène codant pour la thanatine au moyen d'un vecteur approprié.

5 Par thanatine, on entend selon l'invention tout peptide comprenant essentiellement la séquence peptidique de 11 acides aminés décrite dans la demande de brevet FR 2 733 237, ainsi que les séquences homologues équivalentes dans lesquelles certains acides aminés sont remplacés par des acides aminés différents mais équivalents sur des sites n'induisant pas de modification substantielle de l'activité antifongique ou antibactérienne
10 de la dite séquence homologue. Par séquence peptidique comprenant essentiellement la séquence peptidique décrite dans la demande de brevet FR 2 733 237, on entend non seulement la séquence définie par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), mais également une telle séquence comprenant à l'une ou l'autre de ses extrémités, ou les deux, des résidus peptidiques nécessaires à son expression et ciblage dans un organisme hôte, en
15 particulier une cellule végétale ou une plante.

La thanatine est un peptide de formule (I):

Xaa- Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys- Xab

(I)

dans laquelle:

20 Xaa est NH₂ ou un reste variable de séquence comprenant de 1 à 10 acides aminés, et

Xab est OH ou un reste variable de séquence comprenant de 0 à 5 acides aminés.

De manière avantageuse, lorsque Xaa comprend au moins un acide aminé, celui-ci est l'un des 20 acides aminés de base et plus particulièrement choisi dans le groupe
25 comprenant Gly, Ser, Lys, Pro et Val. Lorsque Xab comprend au moins un acide aminé, celui-ci est l'un des 20 acides aminés de base et plus particulièrement choisi dans le groupe comprenant Gln, Arg et Met.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les 2 résidus cystéines du peptide de formule (I) forment un pont disulfure intramoléculaire.

30 La présente invention concerne donc d'abord un fragment d'acide nucléique, en particulier d'ADN, codant pour la thanatine définie ci-dessus. Il peut s'agir selon l'invention d'un fragment isolé de *Psodius sp.*, de préférence *maculiventris*, ou encore un fragment dérivé, adapté pour l'expression de la thanatine dans l'organisme hôte où le peptide sera exprimé. Le fragment d'acide nucléique peut être obtenu selon les méthodes
35 standards d'isolation et de purification, ou encore par synthèse selon les techniques usuelles d'hybridations successives d'oligonucléotides synthétiques. Ces techniques sont notamment décrites par Ausubel & coll.

Selon la présente invention, on entend par « fragment d'acide nucléique » une séquence nucléotidique pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN,

en particulier ADNc, notamment double brin.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le fragment d'acide nucléique codant pour la thanatine comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

De manière avantageuse, le fragment d'acide nucléique selon l'invention comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

Par « homologue », on entend selon l'invention un fragment d'acide nucléique présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à la séquence nucléotidique décrite par l'identificateur de séquence n° 1 ou n° 2 et codant pour la thanatine. Ces modifications peuvent être obtenues selon les techniques usuelles de mutation, ou encore en choisissant les oligonucléotides synthétiques employés dans la préparation de ladite séquence par hybridation. Au regard des multiples combinaisons d'acides nucléiques pouvant conduire à l'expression d'un même acide aminé, les différences entre la séquence de référence décrite par l'identificateur de séquence n° 1 ou n° 2 et l'homologue peuvent être importantes, d'autant plus qu'il s'agit d'un fragment d'ADN de taille inférieure à 100 acides nucléiques, réalisable par synthèse. De manière avantageuse, le degré d'homologie sera d'au moins 70 % par rapport à la séquence de référence, de préférence d'au moins 80 %, plus préférentiellement d'au moins 90 %. Ces modifications sont généralement neutres, c'est à dire qu'elles n'affectent pas la séquence primaire de la thanatine résultante.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les cellules végétales ou les plantes, la séquence codante comprenant au moins un fragment d'ADN codant pour la thanatine tel que défini ci-dessus.

Par organisme hôte, on entend tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, dans lequel le gène chimère selon l'invention peut être introduit, pour la production de thanatine. Il s'agit en particulier de bactéries, par exemple *E. coli*, de levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, ou de préférence des cellules végétales et des plantes.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le

tabac, le coton, etc.

Les éléments de régulation nécessaires à l'expression du fragment d'ADN codant pour la thanatine sont bien connus de l'homme du métier en fonction de l'organisme hôte. Ils comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des peptides de transit, des séquences terminatrices, y compris des codons start et stop. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier.

Le fragment d'acide nucléique selon l'invention peut également comprendre une séquence d'acide nucléique fusionnée en 5' et/ou en 3' à la séquence codant pour la thanatine, de manière à obtenir une protéine de fusion « protéine-thanatine », dont la coupure par les systèmes enzymatiques de l'organisme hôte permet la libération de la thanatine. Cette protéine fusionnée à la thanatine peut être un peptide signal ou un peptide de transit qui permet de contrôler et d'orienter la production de la thanatine de manière spécifique dans une partie de l'organisme hôte, comme par exemple le cytoplasme, la membrane cellulaire, ou dans le cas des plantes dans un type particulier de tissus ou dans la matrice extracellulaire.

Selon un mode de réalisation, le peptide de transit peut être un signal d'adressage chloroplastique ou mitochondrial, lequel est ensuite clivé dans les chloroplastes ou les mitochondries.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le peptide signal peut être un signal N-terminal ou « prépeptide », éventuellement en association avec un signal responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ou un peptide d'adressage vacuolaire ou « propeptide ». Le réticulum endoplasmique est le lieu où sont pris en charge par la « machinerie cellulaire » des opérations de maturation de la protéine produite, comme par exemple le clivage du peptide signal.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des plantes. Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase (RuBisCO) ou d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou 35S), ou un promoteur inducible par les pathogènes comme PR-1a du tabac ou AoPRT-L d'asperge, tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante de manière constitutive ou induite par l'attaque d'un pathogène, tel que par exemple, celle comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par

exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (TEV) décrit par Carrington & Freed, ou des peptides de transit, soit simples, soit doubles, et dans ce cas éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale. constituée d'une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande EP 0 508 909. Comme peptide de transit, on peut citer le peptide signal du gène PR-1a du tabac décrit par Cornelissen & coll., représenté avec sa séquence codante par l'identificateur de séquence n° 3.

La séquence codant pour la protéine de fusion peptide signal PR-1a-thanatine et cette protéine de fusion sont également partie de la présente invention. Cette séquence est notamment décrite par l'identificateur de séquence n° 5; plus particulièrement la partie codante de cette séquence, correspondant aux bases 12 à 164.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Selon la présente invention, le gène chimère peut également comprendre un marqueur de sélection adapté à l'organisme hôte transformé. De tels marqueurs de sélection sont bien connus de l'homme du métier. Il pourra s'agir d'un gène de résistance aux antibiotiques, comme la pénicilline, ou encore un gène de tolérance aux herbicides pour les plantes.

La présente invention concerne également un vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de réplication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon l'invention. De tels vecteurs de transformation en fonction de l'organisme hôte à transformer sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de réplication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes

hôtes, en particulier des cellules végétales par intégration d'au moins un fragment d'acide nucléique ou un gène chimère tels que définis ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules ou des protoplastes avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG.

L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

La présente invention a encore pour objet les organismes hôtes, en particulier cellules végétales ou plantes, transformés et contenant une quantité efficace d'un gène chimère comprenant une séquence codante pour la thanatine définie ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépende de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus.

Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de plantes transformées.

Les plantes ainsi transformées sont résistantes à certaines maladies, en particulier à certaines maladies fongiques ou bactériennes. De ce fait, la séquence d'ADN codant pour la thanatine peut être intégrée avec pour objectif principal la réalisation de plantes résistantes aux dites maladies, la thanatine étant efficace contre des maladies fongiques telles que celles causées par *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophthora cinnamomi*.

Le gène chimère pourra comprendre également et de manière avantageuse au moins un marqueur de sélection, tel qu'un ou plusieurs gènes de tolérance aux herbicides.

La séquence d'ADN codant pour la thanatine peut également être intégrée comme marqueur de sélection lors de la transformation de plantes avec d'autres séquences codant pour d'autres peptides ou protéines d'intérêt, comme par exemple des gènes de tolérance aux herbicides.

De tels gènes de tolérance aux herbicides sont bien connus de l'homme du métier et notamment décrits dans les demandes de brevet EP 115 673, WO 87/04181, EP 337 899, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

Bien entendu, les cellules et plantes transformées selon l'invention peuvent comprendre outre la séquence codant pour la thanatine, d'autres séquences hétérologues codant pour d'autres peptides complémentaires susceptibles de conférer à la plante des résistances à d'autres maladies d'origine bactérienne ou fongique.

Les autres séquences peuvent être intégrées au moyen du même vecteur comprenant un gène chimère, lequel comprend une première séquence codant pour la thanatine et au moins une autre séquence codant pour un autre peptide ou protéine d'intérêt.

Elles peuvent également être intégrées au moyen d'un autre vecteur comprenant au moins la dite autre séquence, selon les techniques usuelles définies ci-dessus.

Les plantes selon l'invention peuvent encore être obtenues par croisement de parents, l'un portant le gène selon l'invention codant pour la thanatine, l'autre portant un gène codant pour au moins un autre peptide ou protéine d'intérêt.

Parmi les séquences codant pour d'autres peptides antifongiques, on peut citer celle codant pour la drosomycine, décrite dans la demande de brevet FR 2 725 992 et par Fehlbaum & coll. (1994), et dans la demande de brevet non publiée FR 97 09115 déposée le 24 juillet 1997, ou celle codant pour l'androctonine décrite dans la demande de brevet FR 2 745 004 et dans la demande de brevet non publiée FR 97 10362 déposée le 20 août 1997.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, la préparation de la séquence codant pour la thanatine, du gène chimère, du vecteur d'intégration et des plantes transformées. Les figures 1 à 5 en annexe décrivent les structures schématiques de certains plasmides préparés pour la construction des gènes chimères. Dans ces figures, les différents sites de restriction sont marqués en *italiques*.

Exemple 1: Construction des gènes chimères

Toutes les techniques employées ci-après sont des techniques standard de laboratoire. Les protocoles détaillés de ces techniques sont notamment décrits dans Ausubel & coll.

pRPA-MD-P: Création d'un plasmide contenant le signal peptide du gène PR-1a du tabac.

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 1 et Oligo 2 ci-après, sont hybridés à 65 °C pendant 5 minutes puis par diminution lente de la température à 30°C pendant 30'.

Oligo 1: 5' GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC
ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA CTCTTCTTCT TTTCC 3'

Oligo 2: 5' TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA
GAAGAGTAGA CACAAGAAGG AAAGATGGAA GC 3'

Après hybridation entre l'Oligo 1 et l'Oligo 2, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabricant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction *SacII* et *NaeI* et cloné dans le plasmide pBS II SK(-) (Stratagene) digéré par les mêmes enzymes de restriction. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour peptide signal du gène PR-1a du tabac (SEQ ID NO 3).

pRPA-PS-PR1a-than: Création d'une séquence codant pour la thanatine fusionnée au signal peptide PR-1a sans région non transcrite en 3'.

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires de séquences Oligo 3 et Oligo 4 selon les conditions opératoires décrites pour pRPA-MD-P.

Oligo 3: 5' GGTTCOAAGA AGCCAGTGCC AATCATCTAC TGCAACAGGA
CG 3'

Oligo 4: 5' CCGGATCCGT CGACACGTTC GCCTCGCCGA GCTCACATCC
TCTGGCACTT ACCAGTCCTC CTGTTGCAGT AGATGATTGG
CACTGGC 3'

Après hybridation entre l'Oligo 3 et l'Oligo 4, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabricant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. Cet oligonucléotide double brin contenant la partie codante de la thanatine (SEQ ID NO 1) est ensuite cloné directement

10

Oligo 6: 5' CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT
 GCATGCCTGC AGGTCGACTC TAGAGG 3'

5 L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite lié dans pUC-19 qui a été préalablement digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* et rendu bouts francs en employant le fragment klenow de l'ADN polymérase 1 de *E. coli*. On obtient un vecteur contenant de multiples sites de clonage pour faciliter l'introduction des cassettes d'expression dans un plasmide vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens*. La structure schématique de ce site de clonage multiple est représentée sur la figure 3.

10

pRPA-RD-232: Introduction de la cassette d'expression de PR-1a-thanatine de pRPA-RD-229 dans pRPA-RD-195.

15 Le plasmide pRPA-RD-230 est digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII*. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1a-thanatine est purifié. Le fragment purifié est ensuite lié dans pRPA-RP-195 qui a été préalablement digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII* et déphosphorylé avec la phosphatase intestinale de veau.

pRPA-RD-174: Plasmide dérivé de pRPA-BL-150A (EP 0 508 909) contenant le gène de tolérance au bromoxynil de pRPA-BL-237 (EP 0 508 909).

20 Le gène de tolérance au bromoxynil est isolé de pRPA-BL-237 par une amplification génique par PCR. Le fragment obtenu est à bouts francs et est cloné dans le site *EcoRI* de pRPA-BL-150A qui a été rendu bouts francs par l'action de la polymérase klenow dans des conditions standard. On obtient un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* qui contient le gène de tolérance au bromoxynil à proximité de sa bordure droite, un gène de tolérance à la kanamycine à proximité de sa bordure gauche et un site de clonage multiple entre ces deux gènes.

25 La structure schématique de pRPA-RD-174 est représentée sur la figure 4. Sur cette figure, "nos" représente le site de polyadénylation de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NOS pro" représente le promoteur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NPT II" représente le gène de la néomycine phosphotransphérase du transposon Tn5 de *E. coli* (Rothstein & coll., 1981), "35S pro" représente le promoteur 35S isolé du virus de la mosaïque du chou fleur (Odell & coll., 1985), "BRX" représente le gène de la nitrilase isolé de *K. ozaenae* (Stalker & coll., 1988), "RB" et "LB" représentent respectivement les
 30 bordures droite et gauche de la séquence d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

35

pRPA-RD-184: Addition d'un nouveau site de restriction, unique, dans pRPA-RD-174.

Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 7 et Oligo 8 ci-après,

sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

Oligo 7: 5' CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC
CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT GCTCGAGGGC CCAACCTCAG
TACCTGGTTC AGG 3'

Oligo 8: 5' CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA
CACCTAGGCG CGCCGGGGCC GCGTTTAAAC TTAATTAAGT
GTGGCCTGAC TGG 3'

L'oligonucléotide double brin hybridé (95 paires de bases) est purifié après séparation sur un gel d'agarose (3 % Nusieve, FMC). Le plasmide pRPA-RD-174 est digéré avec l'enzyme de restriction *XmaI*, et le grand fragment d'ADN est purifié. Les deux fragments d'ADN obtenus sont ensuite liés.

On obtient un plasmide dérivé de pRPA-RD-174 comprenant d'autres sites de restriction entre le gène de tolérance au bromoxynil et le gène de la kanamycine marqueur de sélection.

La structure schématique du plasmide pRPA-RD-184 est représentée sur la figure 5 où les termes "nos", "NPT II", "NOS pro", "35S pro", "BRX gene", "RB" et "LB" ont la même signification que pour la figure 4.

pRPA-RD-235: Création d'un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction du gène codant pour la thanatine dirigée vers la matrice extracellulaire.

La plasmide pRPA-RD-232 est digéré avec les enzymes de restriction *PmeI* et *AscI* et le fragment d'ADN contenant le gène de PR-1a-thanatine est purifié. Le plasmide pRPA-RD-184 est digéré avec les mêmes enzymes de restriction. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1a-thanatine est ensuite liée dans pRPA-RD-184. On obtient ainsi un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la séquence codant pour la protéine de fusion PR-1a-thanatine qui conduit à l'expression de la thanatine dans la matrice extracellulaire de la plante.

Exemple 2: Tolérance aux herbicides des tabacs transformés.

2.1- Transformation

Le vecteur pRPA-RD-235 est introduit dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood & coll., 1987) porteuse du cosmide pTVK291 (Komari & coll., 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh & coll. (1985).

2.2- Régénération

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants

foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30 g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et régénérées selon la technique des disques foliaires (Horsh & coll., 1985) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des
5 pousses sur un milieu additionné de 30 g/l de saccharose contenant 0,05 mg/l d'acide naphthylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu
10 d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

2.3- Tolérance au bromoxynil

Vingt plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour la construction pRPA-RD-235. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec
15 une suspension aqueuse de Pardner correspondant à 0,2 kg de matière active bromoxynil par hectare.

Toutes les plantes montrant une tolérance complète au bromoxynil sont ensuite employées dans différentes expérimentations qui montrent que l'expression de la thanatine
20 par les plantes transformées les rend résistantes aux agressions fongiques.

REFERENCES

- Ausubel, F. A. & coll. (eds. Greene). Current Protocols in Molecular Biology. Publ. Wiley
25 & Sons.
- Bevan, M. & coll. (1983). Nuc. Acids Res. 11:369-385.
- Carrington and Freed (1990). J. Virol. 64:1590-1597.
- Ehret-Sabatier & coll. (1996) The Journal of Biological Chemistry, 271, 47, 29537-29544.
- Horsch & coll. (1985). Science 227:1229-1231.
- 30 Jefferson & coll. (1987). EMBO J. 6:3901-3907.
- Komari & coll. (1986). J. Bacteriol. 166:88-94.
- Rothstein & coll. (1981). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 45: 99-105.
- Stalker & coll. (1988). J. Biol. Chem. 263:6310-6314.
- Odell, J.T. & coll. (1985). Nature 313:810-812.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 13

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT:1..33

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT GGT AAG TGC
 Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys
 1 5 10

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 63 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT:1..63

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GGT TCC AAG AAG CCA GTG CCA ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT GGT
 Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly
 1 5 10 15

48

AAG TGC CAG AGG ATG
 Lys Cys Gln Arg Met
 20

63

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 98 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT:1..63

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GGT	TCC	AAG	AAG	CCA	GTG	CCA	ATC	ATC	TAC	TGC	AAC	AGG	AGG	ACT	GGT	48
Gly	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Pro	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asn	Arg	Arg	Thr	Gly	
1				5					10					15		
AAG	TGC	CAG	AGG	ATG	TCAGCTCGGC	GAGGCGAACG	TGTCGACGGA	TCCGG								98
Lys	Cys	Gln	Arg	Met												
				20												

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 106 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMLACEMENT:12..101

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GCGTCGACGC	C	ATG	GGT	TTC	GTG	CTT	TTC	TCT	CAG	CTT	CCA	TCT	TTC	CTT	50	
	Met	Gly	Phe	Val	Leu	Phe	Ser	Gln	Leu	Pro	Ser	Phe	Leu			
	1				5						10					
CTT	GTG	TCT	ACT	CTT	CTT	CTT	TTC	CTT	GTG	ATC	TCT	CAC	TCT	TGC	CGT	98
Leu	Val	Ser	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Val	Ile	Ser	His	Ser	Cys	Arg	
	15					20					25					
GCC	GGCGA															106
Ala																
30																

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 197 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMLACEMENT:12..164

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GCGTCGACGC	C	ATG	GGT	TTC	GTG	CTT	TTC	TCT	CAG	CTT	CCA	TCT	TTC	CTT	50	
	Met	Gly	Phe	Val	Leu	Phe	Ser	Gln	Leu	Pro	Ser	Phe	Leu			
	1				5						10					
CTT	GTG	TCT	ACT	CTT	CTT	CTT	TTC	CTT	GTG	ATC	TCT	CAC	TCT	TGC	CGT	98
Leu	Val	Ser	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Val	Ile	Ser	His	Ser	Cys	Arg	
	15					20					25					
GCC	GGT	TCC	AAG	AAG	CCA	GTG	CCA	ATC	ATC	TAC	TGC	AAC	AGG	AGG	ACT	146
Ala	Gly	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Pro	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asn	Arg	Arg	Thr	
30					35					40					45	

GGT AAG TGC CAG AGG ATG TGAGCTCGGC GAGGCGAACG TGTCGACGGA TCC
Gly Lys Cys Gln Arg Met
50

197

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 75 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 1"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA 60

CTCTTCTTCT TTTCC 75

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 72 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA GAAGAGTAGA CACAAGAAGG 60

AAAGATGGAA GC 72

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 44 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 3"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGTTCCAAGA AGCCAGTGCC AATCATCTAC TGCAACAGGA CG 42

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 97 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 4"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCGGATCCGT CGACACGTTT GCCTCGCCGA GCTCACATCC TCTGGCACTT ACCAGTCCTC 60
CTGTTGCAGT AGATGATTGG CACTGGC 87

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 85 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 5"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC GAGCTCGGTA CCCGGGGATC 60
CTCTAGAGTC GACCTGCAGG CATGC 85

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 110:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 66 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 6"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT GCATGCCTGC AGGTCGACTC 60
TAGAGG 66

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 93 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 7"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT 60
GCTCGAGGGC CCAACCTCAG TACCTGGTTC AGG 93

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 93 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 8"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA CACCTAGGCG CGCCGGGGCC

60

GCGTTTAAAC TTAATTAAGT GTGGCCTGAC TGG

93

REVENDICATIONS

1. Fragment d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique codant pour la thanatine.
- 5 2. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une séquence nucléotidique de type ADN.
3. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique de type ADN comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), une séquence homologue ou une

10 séquence complémentaire de ladite séquence.
4. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 3, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique de type ADN comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2), une séquence homologue ou une

séquence complémentaire de ladite séquence.
- 15 5. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique fusionnée en 5' et/ou en 3' à la séquence codant pour la thanatine, de manière à obtenir une protéine de fusion « protéine-thanatine ».
6. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce que

20 la protéine est un peptide signal ou un peptide de transit.
7. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 6, caractérisé en ce que le peptide signal est le peptide signal du gène PR-1a du tabac.
8. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 5 (SEQ ID NO

25 5), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.
9. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend la partie codante de la SEQ ID NO 5, correspondant aux bases 12 à 164.
10. Protéine de fusion « protéine-thanatine », caractérisée en ce que la protéine est un peptide signal ou un peptide de transit.
- 30 11. Protéine de fusion selon la revendication 10, caractérisée en ce que le peptide signal est le peptide signal du gène PR-1a du tabac.
12. Protéine de fusion selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est décrite par l'identificateur de séquence n° 5 (SEQ ID NO 5).
13. Gène chimère comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de

35 régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les plantes, caractérisé en ce que la séquence codante comprend au moins un fragment d'ADN codant pour la thanatine tel que défini dans les revendications 1 à 9.
14. Gène chimère selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'organisme hôte est choisi parmi les cellules végétales et les plantes.

15. Gène chimère selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisé en ce qu'il comprend également un marqueur de sélection.

16. Vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte caractérisé en ce qu'il comprend au moins une origine de répllication et au moins un gène chimère tel que défini dans les revendications 13 à 15.

17. Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de répllication et d'expression.

18. Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide.

19. Organismes hôtes transformés, caractérisés en ce qu'ils contiennent une quantité efficace d'un gène chimère selon les revendications 13 à 15.

20. Organisme hôte transformé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il s'agit de cellules végétales ou de plantes.

21. Organisme hôte transformé selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une plante contenant des cellules transformées.

22. Organisme hôte selon la revendication 21, caractérisé en ce que la plante est régénérée à partir des cellules transformées.

23. Cellule végétale transformée, caractérisée en ce qu'elle contient un fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère selon les revendications 13 à 15.

24. Plante transformée résistante aux maladies, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cellule végétale transformée selon la revendication 23.

25. Plante transformée selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'elle est résistante aux maladies causées par *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophthora cinnamomi*.

26. Plante transformée résistante aux maladies, caractérisée en ce qu'elle est issue de la culture et/ou du croisement des plantes selon l'une des revendications 24 ou 25.

27. Graines de plantes transformées selon l'une des revendications 24 à 26.

28. Procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales ou des plantes, caractérisé en ce que l'on insère dans ledit organisme hôte au moins un fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère selon l'une des revendication 13 à 15.

29. Procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies fongiques ou bactériennes, caractérisé en ce que l'on insère dans la plante au moins un fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère selon les revendications 13 à 15.

30. Procédé selon l'une des revendications 28 ou 29, caractérisé en ce que le, gène chimère est inséré au moyen d'un vecteur selon l'une des revendications 17 à 19.

30. Procédé selon l'une des revendications 28 ou 29, caractérisé en ce que le, gène chimère est inséré au moyen d'un vecteur selon l'une des revendications 16 à 18.

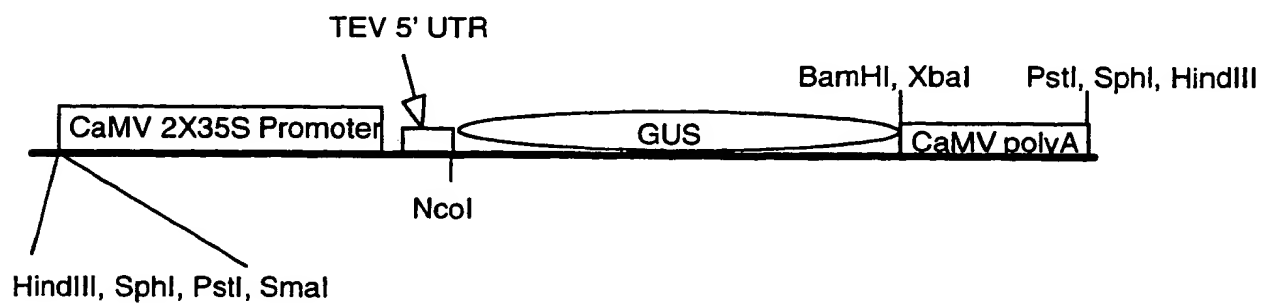


Fig. 1

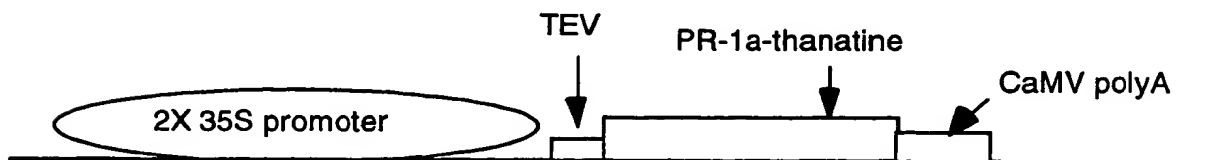


Fig. 2

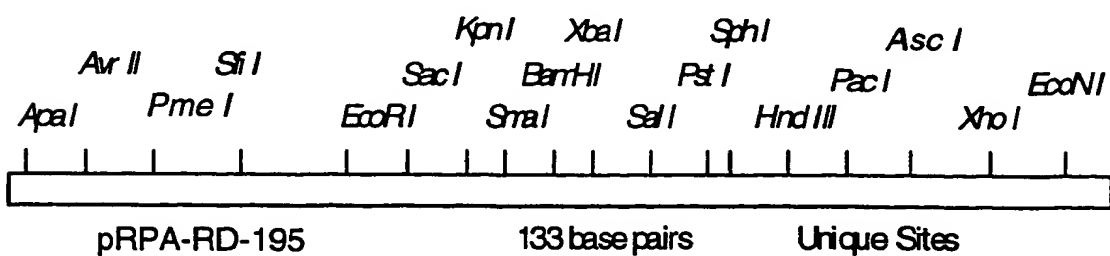
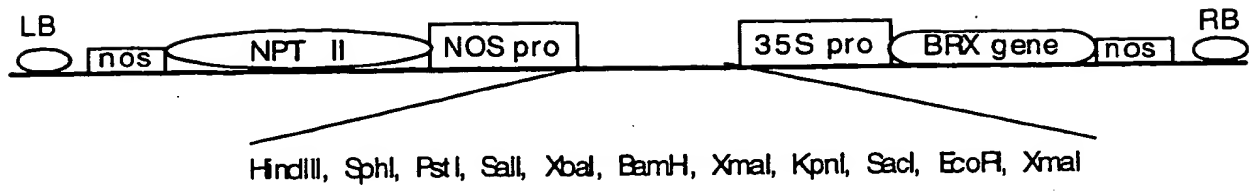
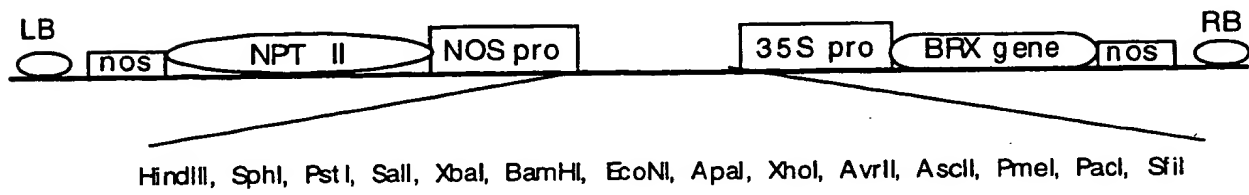


Fig. 3

**Fig. 4****Fig. 5**



4

—

PCT/FR 00/02375